

Porównanie efektywności wybranych metod lizy komórek *Streptomyces* spp. w procesie izolacji całego genomowego DNA

Adrian Augustyniak

Katedra Immunologii, Mikrobiologii i Chemii Fizjologicznej

Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny

Szczecin

Promieniowce z rodzaju *Streptomyces* charakteryzują się wysokim potencjałem biotechnologicznym. Są one powszechnie znanymi producentami antybiotyków, barwników oraz enzymów o znaczeniu przemysłowym. Ich genom składający się zazwyczaj z 8-10 milionów par zasad jest w przypadku licznych szczepów cennym źródłem użytecznych genów, które mogą służyć do celów biotechnologicznych. Izolacja materiału genetycznego tych bakterii bywa jednak problematyczna, dlatego celem badań była ocena efektywności wybranych metod lizy komórek wybranych promieniowców. Materiał badawczy stanowiło 10 szczepów bakterii z rodzaju *Streptomyces*. Drobnoustroje zostały namnożone w podłożu płynnym BHI, komórki następnie poddawano lizie z wykorzystaniem trzech metod: lizy termicznej, lizy termicznej poprzedzonej sonikacją w myjce ultradźwiękowej oraz degradacji enzymatycznej (z użyciem lizozymu i proteiny K). Jakość i czystość wyizolowanych matryc oceniano elektroforetycznie oraz spektroskopowo. Najskuteczniejszą spośród wybranych metod okazała się liza enzymatyczna, gdyż z jej wykorzystaniem udało się uzyskać wysokocząsteczkowe genomowe DNA jednakże o stosunkowo dużym stopniu zanieczyszczenia. W przypadku zastosowania samej lizy termicznej nie udało się wyekstrahować kwasu nukleinowego, natomiast sonikacja, mimo iż wyraźnie zwiększyła efektywność tej metody, powodowała jednocześnie znaczną degradację materiału genetycznego. Uzyskane wyniki dowodzą, iż liza enzymatyczna jest skuteczną i wystarczającą metodą izolacji całego genomowego DNA z komórek promieniowców *Streptomyces* spp.

Wstęp

Gleba jest naturalnym rezerwuarem licznej grupy drobnoustrojów o wysokim potencjale biotechnologicznym. Przykładem są promieniowce, szczególnie z rodzaju *Streptomyces*, które są aktywnymi producentami wielu antybiotyków, enzymów oraz barwników [13, 17, 21]. Te Gram-dodatnie bakterie występują we wszystkich rodzajach gleb. Izolowane były nawet z piasków

pustynnych oraz prób zebranych na Arktyce i Antarktyce [16]. W środowiskach które zasiedlają, odgrywają istotną rolę ekologiczną poprzez m.in. dekompozycję martwej materii organicznej oraz współtworzenie warstwy humusowej gleby i obiegu pierwiastków [5].

Charakterystyczna budowa zarówno morfologiczna, jak i genetyczna *Streptomyces*

spp. oraz zróżnicowana aktywność metaboliczna spowodowały, że bakterie te są nie tylko interesującym materiałem badawczym, ale także istotnym elementem procesów przemysłowych [12]. Wzrost tych bakterii przebiega z wytworzeniem tzw. pseudogrzybni (łac. pseudomycelium) w formie substratowej oraz powietrznej. Z tej ostatniej wytwarzane są spory, które stanowią formę przetrwalną *Streptomyces spp.* w środowisku [4, 5].

Genom omawianych promieniowców, który składa się zwykle z 8-10 milionów par zasad (Mpz) i zawiera nawet 70% par GC, w swojej kompozycji jest liniowy oraz podobny budową do genomu *Borrelia burgdorferi*, czy *Agrobacterium tumefaciens* [2, 4]. Istnieje jednak pewna różnica polegająca na występowaniu na końcach chromosomu *Streptomyces spp.* charakterystycznych białek terminalnych (ang. terminal proteins; TPs), które spinają jego końce i prawdopodobnie uczestniczą w procesie replikacji, pełniąc rolę promotora [19, 20]. Wyróżnia się dwie podstawowe części chromosomu tych promieniowców – rdzeń, w którym znajdują się podstawowe geny metabolizmu (ang. house-keeping genes) oraz ramiona, na których są głównie geny metabolizmu wtórnego oraz końcowe powtórzenia odwrócone (ang. terminal inverted repeats; TIRs) stanowiące niejako telomery chromosomu [4].

Ze względu na specyfikę budowy oraz właściwości warunkujące przystosowanie się tych bakterii do środowiska izolacja DNA bywa problematyczna [6, 9]. Zgodnie z danymi literaturowymi w ścianie komórkowej tych bakterii występują zmodyfikowane kwasy tejchojowe oraz lipotejchojowe, które zmieniają jej wytrzymałość [14, 18]. Wydaje się jednak, że poważniejszym problemem przy izolacji genomowego DNA tych

drobnoustrojów jest występowanie w pobliżu ściany komórkowej licznych nukleaz, które są wysoce specyficzne względem sekwencji zawierających wysoką koncentrację par GC. Te nukleazy są wykorzystywane przez bakterie z rodzaju *Streptomyces* w trakcie procesu programowanej śmierci komórek prowadzącej do przekształcenia pseudogrzybni substratowej w powietrzną [1].

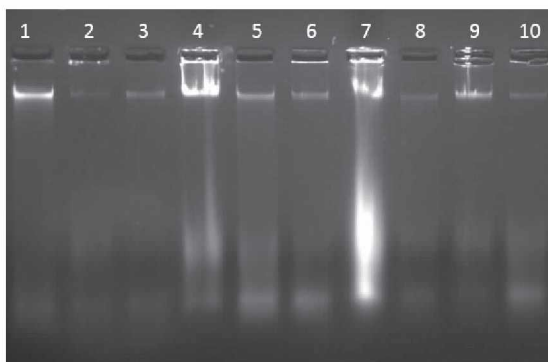
Materiał

Materiał badawczy stanowiło 10 szczepów *Streptomyces spp.* wyizolowanych z gleby ogrodniczej w czystej hodowli, które zostały oznaczone na podstawie cech morfologicznych, biochemicznych oraz obrazu mikroskopowego zgodnie z charakterystyką zawartą w Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2012).

Metody

Bakterie były namnażane w postaci czystych kultur w 1 mL płynnego podłoża Brain Heart Infusion Broth (BHI; Oxoid) przez 7 dni w temperaturze 28°C. Hodowle prowadzono w probówkach typu Eppendorf o objętości 1,5 mL. Po procesie inkubacji odwirowywano hodowle przez dwie minuty (16 000 x g) i zlewano supernatant. Następnie zawieszano pelet w 100 µL jałowej wody. W tak przygotowanych próbkach przeprowadzano proces lizy komórek, wykorzystując do tego trzy metody. Pierwszą procedurą wykorzystywaną w izolacji DNA była, zaproponowana przez Oseka i in. [10], metoda termiczna wykonana we własnej modyfikacji polegającej na zwiększeniu objętości próby z 25 µL do 100 µL – w celu ujednolicenia warunków testowych dla wszystkich sprawdzanych metod. Polegała ona na inkubacji prób w termobloku (Peglab HX-1) w temperaturze 99°C przez 10 minut, a następnie ich gwałtownym schłodzeniu w bloku lodowym. Drugą me-

tołą było uzupełnienie lizy termicznej o dodatkową, trwającą 3 minuty sonikację w myjce ultradźwiękowej, zatem dodatkowym czynnikiem lizującym były w tym wypadku fale dźwiękowe. W trzeciej metodzie przeprowadzono enzymatyczną lizę komórek badanych bakterii przy pomocy lizozymu oraz proteiny K (A&A Biotechnology). Próbkę inkubowano z lizozymem (1,68 mg/mL) przez 30 minut, a później z proteiną K (3,36 mg/mL). W następnym etapie enzymy były inaktywowane w termobloku w temperaturze 70°C przez 10 minut. Jako czynnik precypitujący wykorzystano schłodzenie w bloku lodowym. Próby inkubowano w niskiej temperaturze przez 5 minut, a następnie odwirowywano przez 2 minuty (16000 x g). Ilość i jakość wyizolowanych matryc była oznaczana poprzez pomiar spektrofotometryczny oraz elektroforezę na żelu agarozowym. Pomiar spektrofotometryczny wykonywano z wykorzystaniem płytek 96-dołkowych na spektrofotometrze NanoQuant infinite M200Pro (Tecan). W pomiarze absorbancji zastosowano trzy długości fal – 260 nm (optimum dla DNA), 280 nm (optimum dla białek) oraz 900 nm (pomiar tła). Czystość oceniano na podstawie RATIO 260/280, natomiast stężenie obliczano ze wzoru „ $C = (A_{260} - A_{900}) \times 50$ ”, gdzie „C” oznacza potencjalne stężenie kwasu nukleinowego, „ $A_{260} - A_{900}$ ” to różnica ab-



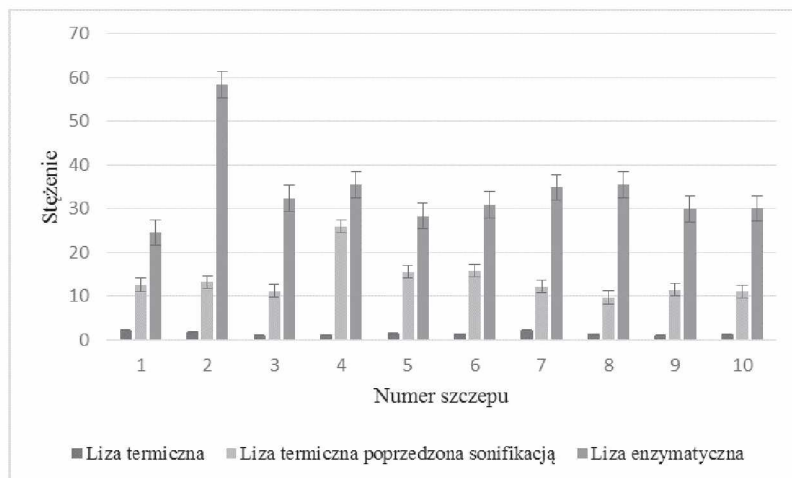
Ryc.1. Elektroforegram ukazujący matryce wyizolowane z wykorzystaniem metody opartej na lizie enzymatycznej; numerami 1-10 oznaczono badane szczepy.

sorbancji uzyskana po odjęciu wyniku tła od wartości uzyskanej w pomiarze DNA. Liczba „50” stanowi współczynnik stosowany w pomiarach DNA dlatego, że dla długości fali wynoszącej 260 nm absorbancja równa 1 jest odpowiednikiem stężenia DNA wynoszącego 50 µg/mL [15]. Do rozdzielów elektroforetycznych sporządzano 2% żel agarozowy (Basica LE Prona) z dodatkiem bromku etyldyny 0,003% (v/v) (Merck) i rozdzielano próbki przy napięciu wynoszącym 90 V przez 60 minut. Analizę statystyczną wyników wykonywano za pomocą programów MS Excel oraz Statistica 10.

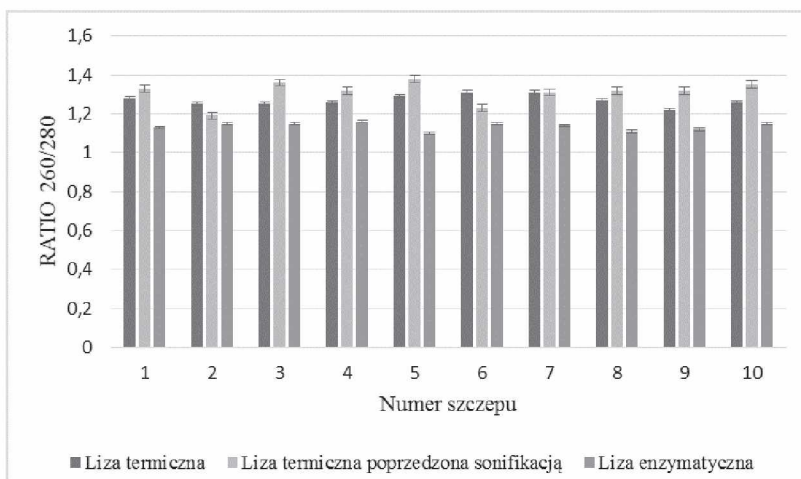
Wyniki

Wyniki analizy spektrofotometrycznej korelowały z obserwacjami dokonanymi przy użyciu elektroforezy na żelu agarozowym. Przy wykorzystaniu techniki lizy termicznej nie uzyskano matryc DNA, które miałyby wystarczającą koncentrację i jakość do zaobserwowania na elektroforegramie. Liza termiczna poprzedzona preinkubacją w myjce ultradźwiękowej poskutkowała natomiast pozyskaniem genomowego DNA jednakże charakteryzującego się niską jakością, co uwidaczniało się w postaci smug (tzw. smirów) w obrazie elektroforetycznym. Liza enzymatyczna jako jedyna z wykorzystanych metod pozwoliła na uzyskanie wysokocząsteczkowego DNA widocznego w postaci regularnych prążków na żelu agarozowym (Ryc. 1).

Poza wyraźnymi prążkami na przedstawionym elektroforegramie zaobserwowano dodatkowo smugi stanowiące zdegradowany materiał genetyczny, podobnie jak w przypadku lizy termicznej poprzedzonej preinkubacją w myjce ultradźwiękowej. Najwyższe stężenie DNA udało się oznaczyć w przypadku lizy enzymatycznej, natomiast najniższe odczytano dla matryc izolowanych z użyciem niemodyfikowanej



Ryc. 2. Porównanie stężeń bakteryjnego DNA wyekstrahowanego z użyciem analizowanych metod lizy komórek *Streptomyces* spp.; numerami 1-10 oznaczono badane szczepy.



Ryc. 3. Porównanie stopnia czystości matryc wyekstrahowanych z użyciem analizowanych metod lizy komórek *Streptomyces* spp.; numerami 1-10 oznaczono badane szczepy.

lizy termicznej (Ryc. 2). Stwierdzono statystycznie istotne różnice pomiędzy uzyskanymi stężeniami względem zastosowanych metod na podstawie testu t-Studenta, przy poziomie istotności $p = 0,05$.

Czystość badanych matryc była najwyższa w przypadku prób uzyskanych po lizie termicznej z preinkubacją w myjce ultradźwiękowej oraz niemodyfikowanej lizie termicznej. Wyniki dotyczące czystości wyizolowanego DNA uzyskane w przypadku tych dwóch metod nie różnią się statystycznie według testu t przy poziomie istotności $p = 0,05$. Odnotowano natomiast statystycznie istotną różnicę pomiędzy

wartościami czystości DNA pomiędzy uzyskanymi po pomiarze eluatów uzyskanych metodami lizy termicznej i lizy enzymatycznej. Niemniej jednak w przypadku żadnej z badanych metod nie oznaczono takiego poziomu czystości matrycy, który byłby wystarczający do wykorzystywania jej w dalszych badaniach bez dodatkowego procesu oczyszczania (Ryc. 3).

Dyskusja

Wysoka temperatura jest czynnikiem, który wykorzystuje się w procesie izolacji genomowego DNA z bakterii [10]. Nie jest ona jednak wystarczającym czynnikiem dla ekstrakcji kwasów nukleinowych z komórek

Streptomyces spp., czego skutkiem był brak sygnału na żelu agarozowym oraz niskie stężenie (sięgające średnio 1,49 µg/mL) w pomiarach na spektrofotometrze. Fakt ten potwierdzają wyniki uzyskane przez Kutchma i in. [6]. Wykorzystanie ultradźwięków podczas preinkubacji w myjce ultradźwiękowej istotnie zwiększyło ilość zebranego DNA, natomiast nie doprowadziło do uzyskania obrazu wysokocząsteczkowych matryc na żelu agarozowym, a tym samym sugerowanego w danych literaturowych podniesienia efektywności [8]. Stężenie kwasów nukleinowych było jednakże na tyle wysokie (średnio 13,91 µg/mL), że możliwe było zaobserwowanie smug świadczących o degradacji materiału genetycznego najprawdopodobniej wskutek fragmentacji spowodowanej przez fale soniczne. Przyczyną degradacji materiału genetycznego mogła być również następująca po etapie sonikacji inkubacja w termobloku. Zakładając, że energia fal dźwiękowych była wystarczająca by zniszczyć komórki, DNA które zostało z nich wyosobnione, podlegało działaniu temperatury wynoszącej 99°C, a zatem wystarczającej do denaturacji podwójnej helisy, co mogło także doprowadzić do degradacji [15]. Problem zdegradowanych matryc dotyczył także prób przeznaczonych do izolacji z wykorzystaniem lizozymu i proteinazy K, mimo że we wszystkich próbach i powtórzeniach uzyskano wysokocząsteczkowe DNA, którego stężenie wynosiło średnio 34,08 µg/mL. Wymienione enzymy są powszechnie wykorzystywane w izolacji kwasów nukleinowych, jednakże w przypadku bakterii z rodzaju *Streptomyces spp.* ich użycie ma dodatkowe znaczenie. Bakterie te w przeciwieństwie do *Nocardia spp.* są wrażliwe na działanie lizozymu [7], zatem ma to także znaczenie taksonomiczne i może stanowić dowód potwierdzający, że wyizolowane matryce pochodzą od bakterii z rodzaju *Streptomyces*. Proteinaza K, poza niszcze-

niem m.in. białek membranowych, jest aktywna także przeciw nukleazom, które u badanych bakterii występują w dużej ilości i stanowią jedną z ich cech charakterystycznych [1, 5]. Dzięki temu wykorzystany enzym dodatkowo zapobiega degradacji materiału genetycznego. Na podstawie uzyskanych wyników i w odniesieniu do badań innych autorów potwierdzono, że dla komórek promieniowców z rodzaju *Streptomyces spp.* wybór metody izolacji materiału genetycznego ma znaczny wpływ na uzyskiwaną efektywność procesu [5, 6, 8].

Otrzymane stopnie czystości niezależnie od metody wskazywały na niską jakość wyizolowanych matryc, co spowodowane było pominięciem etapu oczyszczania DNA z białek i cukrów, które stanowiły komponenty zniszczonych komórek, ich metabolity oraz pozostałe po hodowli komponenty podłoża. Z tego względu bakterie namnażane były w podłożu płynnym, gdyż dla materiału pobieranego z podłoża stałego istnieje duże ryzyko przeniesienia fragmentów podłoża (w tym agaru), co może skutkować jeszcze większym zanieczyszczeniem matryc [5, 12]. Dla czystego kwasu nukleinowego wartość RATIO 260/280 powinna mieścić się w granicach 1,8-2,0. Uzyskane w wyniki kształtują się poniżej poziomu 1,5, który świadczy o dużym zanieczyszczeniu białkami. Gdyby wartości przekroczyły wartość 2,0 prawdopodobne zanieczyszczenie stanowiłyby cukry [15]. Wartości przedstawione na Rycinie 3 uległyby zmianie, gdyby w badaniach zastosowano dodatkowo metodę oczyszczania, np. z wykorzystaniem kolumnienek zawierających złoża krzemionkowe. Inną proponowaną w literaturze metodą zwiększającą czystość eluatów jest wykorzystanie techniki wirowania w gradiencie chlorku cezu [5]. Wydaje się natomiast, iż bardziej precyzyjne oznaczanie stężenia materiału ge-

netycznego byłoby możliwe z użyciem metody opartej na fluorymetrii, która wykrywa specyficzne połączenia między barwnikiem a kwasem nukleinowym. Uzyskane wyniki sugerują, że zgodnie z danymi źródłowymi izolacja genomowego DNA z bakterii *Streptomyces spp.* jest utrudniona [6, 8], nieefektywna w przypadku metod opartych jedynie na lizie termicznej, jednakże możliwa do wykonania z zachowaniem stosunkowo prostego protokołu przy wykorzystaniu lizozymu oraz proteiny K.

Wnioski

Przeprowadzana w jednej probówce liza enzymatyczna ściany komórkowej promieniowców z rodzaju *Streptomyces* połączona z ekspozycją na wysoką i niską temperaturę pozwala na efektywną, a jednocześnie prostą i szybką izolację całego genomowe-

go DNA z komórek tych bakterii.

Wykorzystanie ultradźwięków jako czynnika lizującego ścianę komórkową podnosi efektywność lizy, ale jednocześnie w znaczący sposób wpływa na degradację DNA, co jest zjawiskiem niekorzystnym w kontekście prowadzenia dalszych analiz ukierunkowanych na pozyskanie optymalnych ilości materiału genetycznego.

Poszukiwanie nowych i/lub modyfikowanie istniejących metod umożliwiających wydajną izolację bakteryjnego DNA jest konieczne ze względu na specyficzne cechy morfologiczne komórek bakterii oraz zwiększający się poziom zaawansowania technik badawczych.

Bibliografia:

1. Fernandez M., Sanchez J.: Nuclease activities and cell death processes associated with the development of surface cultures of *Streptomyces antibioticus* ETH 7451. *Microbiology* 2002; 148, 405-412
2. Galperin M.Y. Linear chromosomes in bacteria: no straight edge advantage? *Environmental Microbiology* 2007; 9, 1357-1362
3. Goodfellow M., et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Ed., Vol. 5: The Actinobacteria. Part B., Springer Verlag, New York, Dordrecht, Heidelberg, London 2012
4. Hopwood D.A. Soil To Genomics: The *Streptomyces* Chromosome. *Annual Review of Genetics* 2006; 40, 1-23
5. Kieser T., et al. *Practical Streptomyces Genetics*. Johnnes inner foundation, Norwich 2000.
6. Kutchma A.J., et al. Small-Scale Isolation of Genomic DNA from *Streptomyces* Mycelia or Spores. *BioTechniques* 1998; 24, 452-457
7. Mordarska H., et al. Differentiation of *Nocardioform* Actinomycetes by Lysozyme Sensitivity. *Journal of General Microbiology* 1978; 109, 381-384
8. More M.I., et al. Quantitative Cell Lysis of Indigenous Microorganisms and Rapid Extraction of Microbial DNA from Sediment. *Applied and Environmental Microbiology* 1994; 60(5), 1572-1580
9. Nikodinovic J., et al. High yield preparation of genomic DNA from *Streptomyces*. *BioTechniques* 2002; 35, 932-936
10. Osek J., et al. Molekularna charakterystyka i analiza klonalna szczepów *Escherichia coli* grupy O157 pochodzących z różnych źródeł. *Medycyna Weterynaryjna* 2002; 58(8), 590-593
11. Papagianni M. Recent advances in engineering the central carbon metabolism of industrially important bacteria. *Microbial Cell Factories* 2012; 11:50 (<http://www.microbialcellfactories.com/content/11/1/50>)

12. Picard C., et al. Detection and Enumeration of Bacteria in Soil by Direct DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 1992; 58(9), 2717-2722
13. Raja A., Prabakaran P. Actinomycetes and Drug-An Overview. *American Journal of Drug Discovery and Development* 2011; 1, 75-84
14. Shashkov A.S., et al. Novel teichulosonic acid from cell wall of *Streptomyces coelicolor* M145. *Carbohydrate Research* 2012; 359, 70-75
15. Słomski R., et al. Izolacja DNA. W: *Analiza DNA teoria i praktyka*. Red. R. Słomski. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2011, 44
16. Solecka J., et al. Promieniowce - występowanie i wytwarzanie związków biologicznie czynnych. *Postępy Mikrobiologii* 2013; 52, 83-91
17. Stankovic N., et al. *Streptomyces* sp. JS520 produces exceptionally high quantities of undecylprodigiosin with antibacterial, antioxidative, and UV-protective properties. *Appl. Microbiol. Biot.* 2012; 96, 1217-1231
18. Streshinskaya G.M., et al. A novel teichoic acid from the cell wall of *Streptomyces* sp. VKM Ac-2275. *Carbohydrate Research* 2007; 342, 659-664
19. Tsai H., et al. Linear *Streptomyces* plasmids form superhelical circles through interactions between their terminal proteins. *Nucleic Acids Research* 2011; 39, 2165-2174
20. Tsai H., Shu H., Yang C., Chen C.W. Translesion-synthesis DNA polymerases participate in replication of the telomeres in *Streptomyces*. *Nucleic Acids Research* 2012; 40, 1118-1130
21. Xiong Z., Zhang Z., Li J., Wei S., Tua G. Characterization of *Streptomyces padanus* JAU4234, a Producer of Actinomycin X2, Fungichromin, and a New Polyene Macrolide Antibiotic. *Applied and Environmental Microbiology* 2012; 78, 589-592